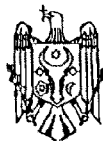




MD 1090 Y 2016.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1090** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 1/08 (2006.01)
A01N 43/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2016 0028 (22) Data depozit: 2016.02.26	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.11.30, BOPI nr. 11/2016
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: SMEREA Svetlana, MD; ANDRONIC Larisa, MD; MACOVEI Ecaterina, MD; MAȘCENCO Natalia, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de inducere a haploizilor la orz

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de inducere a haploizilor la orz.

Procedeul, conform invenției, include colectarea spicelor la etapa de microsporogeneză, sterilizarea acestora, menținerea la întuneric la o temperatură de 4°C în decurs de 3 zile, excizarea anterelor din spiculețul central al părții de mijloc a spicului, inocularea anterelor într-un mediu nutritiv ce conține 0,7 M manitol, 40 mM CaCl₂ și 8 g/l agaroză și incubarea la întuneric la o

2
temperatură de 24°C timp de 4 zile, transferarea anterelor pe mediul nutritiv de inducere FHG cu un conținut de Ficol de 200 g/l și suplimentat cu 0,0001% de glicozide iridoice obținute din plante de *Linaria genistifolia*, menținerea la întuneric la o temperatură de 24°C în decurs de 12..14 zile, după care anterele cu răspuns pozitiv se transferă pe mediul FHG cu un conținut de Ficol de 400 g/l.

Revendicări: 1

MD 1090 Y 2016.11.30

(54) Process for haploid induction in barley

(57) Abstract:

1

The invention relates to biotechnology, particularly to a process for haploid induction in barley.

The process, according to the invention, comprises the collection of ears at the stage of microsporogenesis, their sterilization, maintenance in the dark at a temperature of 4°C for 3 days, excision of anthers from the spikelet of the middle part of the ear, inoculation of anthers in a nutrient medium containing 0.7 M mannitol, 40 mM CaCl₂ and 8 g/l agarose and incubation in the dark at a

2

temperature of 24°C for 4 days, transfer of anthers onto the FHG induction nutrient medium containing Ficoll of 200 g/l with the addition of 0.0001% of iridoid glycosides derived from *Linaria genistifolia* plants, maintenance in the dark at a temperature of 24°C for 12...14 days, after which the anthers with positive response are transferred onto the FHG nutrient medium containing Ficoll 400 g/l.

Claims: 1

(54) Способ индуцирования гаплоидов у ячменя

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу индуцирования гаплоидов у ячменя.

Способ, согласно изобретению, включает сбор колосьев на этапе микроспорогенеза, их стерилизацию, выдерживание в темноте при температуре 4°C в течение 3 дней, выделение пыльников из колоска средней части колоса, инокуляцию пыльников в питательную среду, содержащую 0,7 М маннитола, 40 mM CaCl₂ и 8 г/л агарозы, и инкубацию в темноте при температуре 24°C

2

в течение 4 дней, перенос пыльников на индукционную питательную среду FHG с содержанием фикола 200 г/л с добавлением 0,0001% иридоидных гликозидов, полученных из растений *Linaria genistifolia*, выдерживание в темноте при температуре 24°C в течение 12...14 дней, после чего пыльники с положительным ответом переносят на питательную среду FHG с содержанием фикола 400 г/л.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de inducere a haploizilor la orz.

- 5 Una din cele mai aplicabile metode de inducere a haploizilor la orz este cultura *in vitro* a anterelor ca urmare a inducerii embriogenezei microsporale. Această cale este de perspectivă, fiind utilizată pe larg în crearea a numeroase linii de cereale, dar reușita acestei tehnici este influențată în primul rând de factorii genetici, care determină frecvența formării calusurilor și embrionilor.
- 10 Deosebit de important în obținerea răspunsului pozitiv în cultura anterelor este pretratamentul spicelor/anterelor și componența mediilor nutritive ce conduc microsporii spre formarea de structuri embriogene.

- Este cunoscut procedeul bazat pe prelevarea spicelor la stadiul de microspori uninucleați (ce corespunde fazei de burduf), sterilizarea și plasarea în cutii Petri cu puțină apă distilată sterilă pentru 3 zile în frigider la 4°C, excizarea anterelor,
- 15 inocularea lor pe mediul nutritiv ce conține manitol (0,7M), CaCl₂ (40mM) și agaroză (8g/l) și incubarea la întuneric timp de 4 zile la 24°C, după care acestea sunt transferate în cutii Petri ce conțin mediul de inducere FHG și plasate la întuneric la o temperatură de 24°C [1].

- 20 Neajunsul procedurii cunoscut este rata redusă a anterelor ce prezintă răspuns pozitiv la condițiile *in vitro* în vederea obținerii plantelor haploide.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în sporirea cotei de antere care formează structuri embriogene de natură microsporală.

- Invenția soluționează problema prin aceea că se propune un procedeu de
- 25 inducere a haploizilor la orz, care include colectarea spicelor la etapa de microsporogeneză, sterilizarea acestora cu clorură și cu alcool etilic de 70%, plasarea în cutii Petri cu apă distilată sterilă, menținerea la întuneric la o temperatură de 4°C în decurs de 3 zile, excizarea, sub un microscop binocular, a anterelor din spiculețul central al părții de mijloc a spicului, inocularea anterelor
- 30 într-un mediu nutritiv ce conține 0,7 M manitol, 40 mM CaCl₂ și 8 g/l agaroză în cutii Petri, izolarea cutiilor cu parafilm și incubarea la întuneric la o temperatură de 24°C timp de 4 zile, transferarea anterelor pe mediul nutritiv de inducere FHG cu un conținut de Ficol de 200 g/l și suplimentat cu 0,0001% de glicozide iridoice, obținute din plante de *Linaria genistifolia*, prin extragere cu soluție
- 35 hidrometanolică la fierbere și separare cromatografică ulterioară, menținerea la întuneric la o temperatură de 24°C în decurs de 12..14 zile, după care anterele cu răspuns pozitiv se transferă pe mediul FHG cu un conținut de Ficol de 400 g/l.

- Glicozidele iridoice sumare (GIS) din *Linaria genistifolia* s-au obținut din material vegetal uscat (300 g partea aeriană). La materialul vegetal mărunțit s-au
- 40 adăugat 1,5 l de soluție apoasă de metanol 60%, apoi a fost supus refluxului prin fierbere timp de 6 ore, procedura fiind repetată de 3 ori. Extractele obținute au fost combinate și concentrate prin distilare în vid, după care reziduul apos a fost decantat cu cloroform. Frația apoasă a fost trecută prin coloană cu Sephadex LH-20. Coloana a fost spălată consecutiv cu apă, soluție apoasă de metanol de
- 45 10% și metanol pur. Ambele eluate metanolice au fost combinate și evaporate prin distilare în vid până la uscare. Extractul uscat obținut (4,6 g) reprezintă GIS (MASHCENKO, N.; GUREV, A.; LUPASCU, G.; GORINCIOI, E. Iridoid glycosides from *Linaria genistifolia* (L.) Mill. in biological control of soil-borne fungal pathogens of wheat and some structure consideration. *Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry*. 2015, 10 (1), 57-63).
- 50

Rezultatul invenției constă în sporirea cotei de antere care formează structuri embriogene de natură microsporală în crearea haploizilor la orz.

Exemplu de realizare a invenției

- În cercetare au fost antrenate soiurile de orz Strălucitor, Ciuluc și Galactic.
- 55 Plantele au fost crescute în condiții de câmp conform tehnicilor standard. Spicele au fost colectate la etapa de microsporogeneză, stadiul microsporilor uninucleați (ce corespunde fazei de burduf). Etapa a fost apreciată prin examinarea citologică a preparatelor temporare prin colorare cu carmină acetică.

Spicele identificate la stadiul de microspori uninucleați au fost colectate. După sterilizare cu clorură de sodiu, spicele au fost trecute prin alcool 70%, apoi plasate în cutii Petri cu puțină apă distilată sterilă pentru 3 zile în frigider la 4°C, întuneric. Pentru fiecare genotip au fost selectate câte cel puțin 5 spice. În incinta boxei cu flux laminar, sub un microscop binocular, din spiculețul central al părții de mijloc a spicului au fost excizate anterele și inoculate pe mediul nutritiv ce conține manitol (0,7M), CaCl₂ (40mM) și agaroză (8 g/l). Cutiile Petri în care au fost inoculate anterele au fost izolate cu parafilm și incubate la 24°C, întuneric, pentru 4 zile. După 4 zile anterele au fost transferate în cutii Petri ce conțin mediul nutritiv de inducere FHG (tabelul 1) și menținute la 24°C, la întuneric. După 12...14 zile anterele cu răspuns pozitiv au fost transferate pe mediu FHG cu conținut de Ficol 400g/l.

Tabelul 1

Compoziția mediului nutritiv utilizat pentru inducerea embriogenezei la orz

Nr.	FHG de inducere a embriogenezei	
	Componentele mediului nutritiv	Cantitatea (mg/l)
Macroelemente		
1	KNO ₃	1900
2	NH ₄ NO ₃	165
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
5	KH ₂ PO ₄	170
6	Fe Na ₂ EDTA	37,5
Microelemente		
7	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
8	H ₃ BO ₃	6,2
9	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
10	KI	0,83
11	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
12	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
13	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Vitamine		
14	Mioinozitol	100
15	Tiamină HCl	0,4
Alți factori		
16	Glutamină	730
17	BAP	1
18	Maltoză	62000
19	Ficol	200000
	pH 5,8	

Procedeeul, conform invenției, include suplimentarea mediului nutritiv de inducere FHG cu GIS (Nr.1). Pentru stabilirea concentrației optime au fost utilizate două variante: 0,001% GIS și 0,0001% GIS. De asemenea, a fost aplicată schema de inoculare fără pretratament (Nr.2), conform căreia după sterilizare anterele au fost plasate pe cele trei variante ale mediului nutritiv de inducere (FHG, FHG+0,001% GIS și FHG+0,0001% GIS).

Conform rezultatelor obținute (tabelul 2) s-a constatat că GIS a prezentat efect stimulator în inducerea reacției pozitive a anterelor pe mediul nutritiv FHG doar în concentrația de 0,0001% (variantea FHG+0,0001% GIS). În varianta fără pretratament GIS a avut un impact pozitiv doar la soiul Ciuluc.

Tabelul 2

Cota anterelor de orz cu răspuns pozitiv la condițiile *in vitro* de cultivare în dependență de pretratamentul aplicat (%)

Genotip	Nr.1 Pretratament			Nr.2 Fără pretratament			Antere inoculate (nr.)
	FHG	FHG+0,001% GIS	FHG+0,0001% GIS	FHG	FHG+0,001% GIS	FHG+0,0001% GIS	
Strălucitor	0,7	0	1,39	0	0	0	144
Ciuluc	0,36	0	0,72	1,07	0	1,61	562
Galactic	0,58	0	1,72	0,58	0	0	175

În varianta cu pretratament (Nr.1) GIS a condus la o creștere a răspunsului pozitiv al anterelor de cca 2 ori la soiurile Ciuluc și Strălucitor, iar la Galactic de 2,97 ori.

După una-două săptămâni de recultivare *in vitro* a anterelor cu răspuns pozitiv a fost atestată inducerea embriogenezei. Capacitatea embriogenă a microsporilor a fost influențată de genotip, precum și procedeul propus (tabelul 3).

Tabelul 3

Capacitatea embriogenă a microsporilor de orz cultivați *in vitro* conform variantei cu pretratament

Genotip	FHG		FHG+0,0001% GIS	
	Cota anterelor cu răspuns pozitiv	Structuri embriogene	Cota anterelor cu răspuns pozitiv	Structuri embriogene
Strălucitor	0,7	1	1,39	1,67
Ciuluc	0,36	2,44	0,72	3,15
Galactic	0,58	1,5	1,72	2,83

Aplicarea schemei cunoscute de inducere a androgenezei pe mediul FHG a generat formarea de la 1 până la 2,4 structuri embriogene per anteră în dependență de genotipul analizat.

Suplimentarea mediului nutritiv FHG cu GIS a favorizat sporirea cotei de structuri embriogene la toate trei genotipuri incluse în studiu. Conform procedeului propus capacitatea embriogenă a sporit la soiul Ciuluc de cca 1,3, la soiul Strălucitor de 1,67, iar la soiul Galactic de 1,89 ori. Creșterea numărului de structuri embriogene formate ca rezultat al diferențierii microsporilor contribuie la eficientizarea căii de obținere a haploizilor la soiurile de orz cu capacitate androgenă redusă.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Cistue L., Valles M. P., Echavarri B., Sanz J.M., Castillo A. Barley anther culture. In: Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B.P., Szarejko I. Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 2003, p. 29-34

(57) Revendicări:

Procedeu de inducere a haploizilor la orz, care include colectarea spicelor la etapa de microsporogeneză, sterilizarea acestora cu clorură și cu alcool etilic de 70%, plasarea în cutii Petri cu apă distilată sterilă, menținerea la întuneric la o temperatură de 4°C în decurs de 3 zile, excizarea, sub un microscop binocular, a anterelor din spiculețul central al părții de mijloc a spicului, inocularea anterelor într-un mediu nutritiv ce conține 0,7 M manitol, 40 mM CaCl₂ și 8 g/l agaroză în cutii Petri, izolarea cutiilor cu parafilm și incubarea la întuneric la o temperatură de 24°C timp de 4 zile, transferarea anterelor pe mediul nutritiv de inducere FHG cu un conținut de Ficol de 200 g/l și suplimentat cu 0,0001% de glicozide iridoice, obținute din plante de *Linaria genistifolia*, prin extragere cu soluție hidrometanolică la fierbere și separare cromatografică ulterioară, menținerea la întuneric la o temperatură de 24°C în decurs de 12..14 zile, după care anterele cu răspuns pozitiv se transferă pe mediul FHG cu un conținut de Ficol de 400 g/l.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2016 0028 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2016.02.26 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) **Titlul: Procedeu de inducere a haploizilor la orz**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 1/08 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

Int.Cl: *A01H 1/04*
A01H 1/06
A01H 1/08
 haploi* orz, cereale

EA, (Eapatis):

Int.Cl: *A01H 1/04*
A01H 1/06
A01H 1/08
 гаплоид* , ячмень, зерновые

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, C	Cistue L., Valles M. P., Echavarri B., Sanz J.M., Castillo A. Barley anther culture. In: Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B.P., Szarejko I. Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 2003, p. 29-34	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2016.08.03	
Examinator COLESNIC Inesa	